*APPY*1™ Test Kit - Español



Uso previsto

La prueba *APPY*1 es un ensayo de diagnóstico in vitro de índice multivariable (IVDMIA) que se emplea para ayudar a identificar pacientes con riesgo bajo de apendicitis aguda. La prueba *APPY*1 mide las concentraciones del complejo heterodimérico de proteína mieloide-relacionada MRP 8/14 (calprotectina) y proteína C reactiva (CRP) en plasma con EDTA mediante inmunoensayo de flujo lateral. Las concentraciones cuantitativas de MRP 8/14 y CRP, además del recuento leucocitario determinado de forma independiente, se analizan mediante un algoritmo preprogramado exclusivo con el fin de generar una resulta de la prueba *APPY*1.

Indicaciones de uso

La prueba *APPY*1 está indicada para su uso en pacientes pediátricos, adolescentes y adultos jóvenes de 2 a 20 años de edad con dolor abdominal y otros signos y síntomas físicos y clínicos que sugieran apendicitis aguda.

Exclusivamente para uso profesional

Resumen y explicación

El diagnóstico de pacientes que se presentan con dolor abdominal sigue siendo uno de los problemas más comunes y desafiantes de la medicina de urgencias. Más de 22,2 millones de pacientes acudieron a las unidades de urgencias de los hospitales europeos y estadounidenses en 2010 a causa de dolor abdominal.[1,2]

La mayor incidencia de la apendicitis se registra en los pacientes pediátricos, adolescentes y adultos jóvenes de 10 a 19 años de edad,[3] pero el diagnóstico de apendicitis en estos pacientes sigue siendo un reto debido la una amplia variedad de características clínicas atípicas que presentan los niños.[4] Hasta el 50% de todos los bebés y niños jóvenes con AA pueden presentar signos y síntomas atípicos[5] que pueden retrasar el diagnóstico y conllevan complicaciones potencialmente fatales como una perforación del apéndice, abscesos abdominales, peritonitis, septicemia y choque. Por ello, es muy importante contar con herramientas diagnósticas que ayuden a alcanzar un diagnóstico objetivo, puntual y preciso, y que permitan estratificar el riesgo de los pacientes con posible apendicitis aguda (AA).

En la actualidad, la capacidad para diagnosticar con precisión la apendicitis se limita a recopilar un conjunto de signos y síntomas físicos y clínicos, y a distintos modos de diagnóstico. Con el fin de ayudar a diagnosticar la apendicitis, se han desarrollado distintas herramientas de predicción clínica que traducen los síntomas clásicos en puntos de datos. El rendimiento de esos sistemas de puntuación es inconsistente y muy variable.[5,6] Además, las unidades de urgencias no usan estos sistemas de forma rutinaria.[7] No obstante, sí suele realizarse un recuento leucocitario de forma rutinaria, aunque ha demostrado ser poco útil como marcador exclusivo, e incluso combinado con signos y síntomas que sugieren una AA.[8] Dependiendo de la evaluación inicial del riesgo del paciente que haga el médico, en los casos en los que la presentación clínica sea inequívoca y se necesite más información se pueden pedir pruebas radiológicas de diagnóstico, como ecografía abdominal o tomografía computarizada (TC) con o sin contraste. Aunque la TC permite diagnosticar la apendicitis aguda con precisión si el apéndice se puede ver con claridad, el uso de esta técnica conlleva un riesgo importante debido a la mayor exposición a la radiación ionizante y, por tanto, aumenta la dependencia de las pruebas menos dañinas.[9-12] Los últimos informes demuestran que el uso de TC en la población pediátrica se ha estabilizado; no obstante, las dudas relativas a la exposición que plantea la TC, en particular en los pacientes más jóvenes, no se ha reducido.[12,13]

En vez de emplear un solo marcador, la combinación de tres biomarcadores de la prueba *APPY*1 mejora la capacidad para identificar pacientes con riesgo bajo.[7] La prueba *APPY*1, junto con los hallazgos físicos y clínicos, ofrece una información objetiva adicional que ayuda en la toma de decisiones de estratificación según el riesgo de los pacientes que se presentan con dolor abdominal susceptible de ser apendicitis aguda. Aquellos pacientes identificados como de bajo riesgo con la prueba *APPY*1 pueden tratarse de forma más tradicional, p. ej. realizando las menos pruebas adicionales o radiológicas posibles o incluso ninguna, solo observación o incluso el alta.

Principios de la prueba

El *APPY*1 System consta del instrumento *APPY*Reader™ (el lector), un casete de prueba *APPY*1 de un solo uso, un vial de un solo uso de amortiguador para solución y un vial de un solo uso de anticuerpos liofilizados conjugados con micropartículas con marcadores fluorescentes. El procedimiento de la prueba requiere añadir plasma del paciente al amortiguador para disolución, y después reconstituir el conjugado liofilizado con la dilución de plasma/amortiguador. Los complejos de MRP 8/14 y CRP disponibles en la muestra diluida del paciente se unen al conjugado de anticuerpos reconstituidos. Después, se aplica una parte alícuota de esta mezcla al casete de la prueba, donde los complejos de MRP 8/14 y CRP ya fluoromarcados se unen a los anticuerpos correspondientes que hay en la zona de

captura de la membrana de nitrocelulosa. El casete de la prueba se introduce de inmediato en el lector, donde se lee la concentración de cada analito presente en la muestra basándose en la intensidad de la fluorescencia de cada línea de prueba de la zona de captura. La concentración de MRP 8/14 y CRP de la muestra se calcula según las curvas de calibración preprogramadas en el chip RFID de cada casete de prueba. La concentración de ambos marcadores se combina con los valores del recuento leucocitario del analizador hematológico del hospital, y una vez introducidos los valores en el lector exclusivo se emplean para calcular el resultado de la prueba *APPY*1 mediante un algoritmo preprogramado exclusivo. El *APPY*1 System también incluye controles de calidad electrónicos (en seco) y durante el procedimiento (con líquido) para garantizar la integridad de los resultados. El tiempo total necesario para procesar y realizar una prueba es de aproximadamente 20 minutos.

La MRP 8/14 (también denominada S100A8/A9 o calprotectina) es un complejo de proteínas fijadoras del calcio presente en el citoplasma de los neutrófilos que se asocia con enfermedades inflamatorias agudas. Se ha observado que la concentración de MRP 8/14 es alta específicamente en el tejido apendicular y la sangre periférica en pacientes con apendicitis aguda.[15-18]

La proteína C reactiva (CRP) se produce en el hígado y se asocia a la inflamación. La CRP es una proteína de fase aguda que aumenta en distintas enfermedades y afecciones asociadas con la inflamación aguda inespecífica. Las concentraciones altas de CRP en la sangre periférica se han relacionado con la apendicitis aguda.[19-21] Las características funcionales analíticas del ensayo de CRP de la prueba *APPY*1 coinciden con las de un ensayo de CRP de alta sensibilidad (hsCRP), como se puede comprobar más abajo.

El recuento leucocitario total alto se asocia con la apendicitis aguda si los síntomas persisten durante 24 horas o más.[22] La leucocitosis no es específica de la apendicitis aguda ya que también se presenta en otras infecciones y trastornos inflamatorios. Hay estudios que sugieren que un recuento leucocitario normal, junto con unos niveles bajos de MRP 8/14 y CRP, además de otros biomarcadores, reduce la probabilidad de apendicitis aguda.[18]

Reactivos y materiales

- *APPY*1 Test Kit, 25 pruebas REF F10000
  - » Casete de prueba *APPY*1, envasado, 25 unidades
    - Membranas de nitrocelulosa con tiras de anticuerpos monoclonales específicos frente a CRP y MRP 8/14, y un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgY de gallina no relacionado como control interno**.**
  - » Amortiguador de prueba *APPY*1, 990 µl, 25 unidades
  - » Conjugado de prueba *APPY*1, torta liofilizada, 25 unidades
  - » Instrucciones de uso, 1 unidad

Materiales necesarios pero no suministrados

- *APPY*Reader Kit REF F10008
- *APPY*Reader QC Cassette, envasado, 1 unidad REF F10004
- *APPY*1 Control Kit, 10 viales REF F10005
  - » Control *APPY*1 de nivel 1, 40 µl, 5 unidades
  - » Control *APPY*1 de nivel 2, 40 µl, 5 unidades
- Centrifugadora para el procesamiento del plasma, rotor de ángulo fijo a ≥ 45 grados o rotor oscilante, capaz de alcanzar 1300 x g ± 100 (fuerza centrífuga relativa, FCR)
- Micropipetas calibradas y puntas de micropipetas desechables para dispensar 10 µl, 70 µl y 150 µl
- Agitadora
- Mini centrifugadora (para aplicar pulsos a los controles si fuera necesario)
- Equipo de protección individual y recipientes para desechos biopeligrosos

Almacenamiento y estabilidad

- Cuando lo reciba, el *APPY*1 Test Kit debe almacenarse de 2 a 8 ºC (35,6 a 46,4 ºF), alejado de la luz directa. Los componentes del kit deben guardarse en su envase original sin abrir hasta que vayan a usarse. El *APPY*1 Test Kit es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la caja del kit y de los componentes si se almacenan como se recomienda.
- El *APPY*Reader Quality Control (QC) Cassette debe guardarse a 15-30 °C (59-86 °F) en su envase original hasta el primer uso. El QC Cassette es reutilizable, y debe guardarse en su bolsa original y sellarse de nuevo inmediatamente después de cada uso. **No lo deseche. Evite la exposición directa a la luz.**

- El *APPY*1 Control Kit debe almacenarse en su envase original a ≤ -20 °C (-4 °F). **No lo guarde en un congelador sin escarcha.** Solo debe descongelarse justo antes de su uso el número de viales necesarios, y deberán desecharse después de la prueba. **Una vez descongelados, los viales de control 1 y 2 *APPY*1 no se deben volver a congelar.**

Precauciones

Precauciones generales

- Exclusivamente para uso profesional.
- Cada casete de prueba está diseñado para un solo uso con una sola muestra de paciente. Los casetes de prueba no se pueden reutilizar.
- **No mezcle componentes de distintos lotes, ya que los componentes de cada lote están perfectamente ajustados entre sí para obtener un rendimiento óptimo.**
- No saque los casetes de prueba de su envase hasta que vayan a usarse. No saque el conjugado de prueba del envase del kit hasta que vaya a usarse.
- Guarde el *APPY*Reader QC Cassette en su bolsa oscura con cierre reutilizable original después de cada uso. Después de cada uso, devuelva el QC Cassette a su bolsa con cierre reutilizable original. No lo deseche.
- No use viales de control *APPY*1 que se hayan descongelado y vuelto a congelar.
- No pinche ni dañe el casete de prueba durante la manipulación previa al uso. Si se pincha o daña, deséchelo y use un casete de prueba nuevo.
- No use los componentes del kit pasada la fecha de caducidad que se encuentra en la caja del kit y las etiquetas de los componentes.
- Después de poner la muestra a analizar en el puerto para muestras del casete de prueba, cierre el cajetín para casetes de inmediato para iniciar el análisis. Si se retrasa, el resultado de la prueba podría no ser válido.
- Para obtener un resultado válido, deberá introducirse el valor del recuento leucocitario confirmado antes de que pasen 90 minutos desde el inicio de la prueba.
- Todos los materiales que hayan estado en contacto con sangre humana o sus derivados deberán desecharse como residuo biopeligroso.
- El *APPY*1 Control Kit contiene derivados de mezclas de plasma humano. Cada unidad de donante se ha analizado mediante métodos aprobados por la FDA y ha dado negativo en HBsAg, VHC, VIH-1, VIH-2, VIH-1Ag, VIH-1 NAT, ALT y sífilis. Dado que ningún método analítico puede garantizar la ausencia total de agentes infecciosos, los reactivos deben manipularse como plasma humano potencialmente infeccioso. Se recomienda utilizar medidas de precaución universales y seguir las normas de seguridad frente a patógenos de transmisión hemática. Cada centro debe seguir sus propios protocolos institucionales de seguridad en el laboratorio.
- El amortiguador de la prueba contiene un 0,095% de azida sódica como conservante. En caso de contacto con la piel, enjuáguese con agua abundante. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de cobre y plomo y formar azidas metálicas explosivas; aclare con agua abundante cuando deseche el amortiguador.
- Todas las muestras de pacientes deberán manipularse como si fueran agentes potencialmente infecciosos. Se recomienda utilizar medidas de precaución universales y seguir las normas de seguridad frente a patógenos de transmisión hemática. Cada centro debe seguir sus propios protocolos institucionales de seguridad en el laboratorio.

Obtención y almacenamiento de muestras

La sangre del paciente se debe extraer mediante venopunción estándar o una línea IV ya implantada (con irrigación) en un tubo K2-EDTA (tapa lavanda) con 1,8 mg de EDTA/cc de sangre. Después de extraer la sangre, centrifugue el tubo durante 10 minutos a 1300 x g ± 100 (FCR) a temperatura ambiente. **La centrifugación debe iniciarse antes de pasada una (1) hora de la extracción.** La centrifugadora debe tener un rotor fijo con un ángulo de más de 45 grados o un rotor oscilante. Para calcular la conversión de RPM a FCR, consulte el manual del usuario de la centrifugadora, o contacte con el Soporte técnico de Venaxis.

Procedimiento de la prueba

Ajuste del Lector

- Siga las instrucciones de ajuste del lector como se describen en el Manual de uso y/o la Guía de ajuste del *APPY*Reader.
- Regístrese en el lector con la ID del operador asignada.
- Deje que el lector se caliente al menos 10 minutos antes de procesar ninguna muestra de paciente.

Preparación del CC y los reactivos de la prueba

- Si realiza un control de calidad (CC) con líquidos, saque el número de viales de control 1 y 2 del *APPY*1 Control Kit almacenados a ≤ -20 °C. Descongélelos a temperatura ambiente mientras se calienta el lector. Consulte las Instrucciones de uso del *APPY*1 Control Kit para más información.
- Extraiga suficientes casetes, viales de amortiguador y viales de conjugado de prueba del *APPY*1 Test Kit almacenado a 2-8 °C para realizar todas las pruebas necesarias (de CC y muestras de pacientes). Deje que los componentes se estabilicen a temperatura ambiente mientras se calienta el lector.

Uso del QC Cassette

- Utilice el QC Cassette cada día que vaya a realizar pruebas de pacientes y/o antes de procesar los controles 1 y 2. Las muestras de los pacientes no pueden analizarse a no ser que se haya obtenido un resultado válido (PASS, pasa) con el QC Cassette en las 24 horas previas.
- **IMPORTANTE: para mantener la vida útil prevista del QC Cassette, evite su exposición a la luz. Almacene el QC Cassette inmediatamente después de su uso en su bolsa original y vuelva a sellarla. No deseche el QC Cassette hasta la fecha de caducidad.**
- Consulte las instrucciones de uso del *APPY*Reader QC Cassette para más información.

1. Identifíquese como operador o cambie al modo operador.
2. Pulse para mostrar la pantalla **Main Menu** (menú principal).
3. Pulse y hasta resaltar **Maintenance** (mantenimiento) y pulse **Select** (seleccionar).
4. Pulse y hasta destacar **Check *APPY*Reader** (comprobar *APPY*Reader) y pulse Select (seleccionar).
5. Pulse y hasta destacar ***APPY*Reader QC Cassette** (*APPY*Reader QC Cassette) y pulse Select (seleccionar).

   El cajetín del lector se abrirá y aparecerá la pantalla **Insert Cassette** (introducir casete).
   La pantalla ***APPY*Reader QC Cassette** aparecerá cuando finalice la prueba.
6. Para imprimir el resultado de QC Cassette:

   a. Pulse Options (opciones).

   b. Pulse y hasta destacar Print Result (imprimir resultado) y después pulse Select (seleccionar).
7. Para enviar el resultado a un **sistema informático de laboratorio, consulte el Manual del usuario del *APPY*Reader.**
8. Pulse **Back** (anterior) para volver a la pantalla **Check *APPY*Reader** (comprobar *APPY*Reader) o pulse para volver a la pantalla **Main Menu** (menú principal).

- Valores previstos

  a. Si los valores de unidad de fluorescencia relativa (RFU) detectados con el QC Cassette se encuentran dentro de los límites aceptables programados en el chip RFID del QC Cassette, el resultado del análisis será PASS (pasa).

  b. Si los valores de RFU detectados con el QC Cassette se encuentran fuera de los límites aceptables programados en el chip RFID del QC Cassette, el resultado del análisis será FAIL (no pasa), se bloqueará al operador y este no podrá procesar más muestras del paciente. Repita la prueba con un QC Cassette distinto.

  c. Si el resultado del segundo QC Cassette es PASS (pasa), proceda a analizar las muestras de los pacientes.

  d. Si no dispone de un QC Cassette distinto, o si el resultado del segundo QC Cassette es FAIL (no pasa), el lector seguirá bloqueado. Contacte con el Soporte técnico de Venaxis llamando al +1-303-794-2000 o con su distribuidor local para obtener asistencia.

Análisis de muestras del paciente

- Prepare el casete de prueba *APPY*1

1. Inicie sesión como operador o cambie al modo operador.
2. Pulse para mostrar la pantalla **Main Menu** (menú principal) del operador.

3. Pulse y hasta destacar **Run Test** (realizar prueba) y después pulse Select (seleccionar).
4. Introduzca la ID del paciente usando uno de los métodos siguientes:

- *Manualmente*; use el teclado numérico para introducir la ID del paciente.
    a. Pulse **Keypad** (teclado) para introducir letras, espacios y signos de puntuación.
    b. Cuando aparezca el teclado en la pantalla del lector, pulse , , y para destacar el carácter que desee.
    c. Pulse **Confirm & Next** (confirmar y siguiente) para añadir el carácter destacado a la ID del paciente.
    d. Repita los pasos a, b y c como proceda.
    e. Cuando la ID del paciente esté completa, pulse **Back** (anterior) o seleccione **Done** (hecho) para salir del teclado.
- *Usando el lector de códigos de barras opcional externo*; escanee el código de barras del paciente.

5. En pantalla **Enter Patient ID** (introducir ID del paciente), pulse **Confirm** (confirmar).
6. Si dispone del recuento leucocitario, introdúzcalo y pulse **Confirm** (confirmar). De no ser así, pulse **Skip** (omitir). Si pulsa **Skip** (omitir), se le pedirá que introduzca el recuento leucocitario del paciente después de la prueba.
7. Saque el casete de prueba de la bolsa y colóquelo en el cajetín para casetes.

- **Prepare la muestra de plasma del paciente para el análisis**

1. Prepare los viales de amortiguador y conjugado de prueba.
2. Use una punta desechable nueva en la pipeta para cada transferencia.
3. Extraiga 10 µl de muestra de plasma del paciente del tubo de centrifugado K2-EDTA con cuidado para no tocar la capa leucocitaria. Transfiéralos al vial de amortiguador de prueba. Tápelo y agítelo bien a mano o por agitadora.
4. Transfiera 150 µl de la muestra de plasma del paciente diluida al vial de conjugado de prueba. Mezcle bien, infundiendo y extrayendo con la pipeta, asegurandose que toda conjugación sea resuspendida. Evite introducir aire en la mezcla ya que se crearía espuma.

- **Inicie el análisis**

1. Añada inmediatamente 70 µl de la dilución con muestra del paciente/conjugado de anticuerpos al puerto para muestras del casete de prueba.
2. Cierre con cuidado el cajetín. La prueba se iniciará automáticamente.
3. El lector mostrará el estado de la prueba en la pantalla Run Test (realizar prueba).
4. Cuando haya finalizado la prueba, se le pedirá que introduzca el recuento leucocitario o que confirme los valores del recuento introducidos antes de la prueba. El esos momentos el casete de prueba debe seguir en el lector.
5. Vuelva a introducir el recuento leucocitario del paciente y pulse **Confirm** (confirmar). Aparecerá la pantalla **Test Result** (resultado de la prueba).
6. Pulse **Next** (siguiente) para que aparezca la pantalla **Confirm Patient ID** (confirmar ID del paciente).
7. Confirme que la ID del paciente que aparece en pantalla es correcta.

- **Ver e imprimir resultados**

1. Si la ID del paciente es correcta: pulse Confirm (confirmar) para ver el resultado de la prueba en la pantalla Result List (resultados). Si la característica de impresión automática del lector está activada, el resultado se imprimirá automáticamente.
2. Si la ID del paciente es incorrecta:
    - Introduzca la ID del paciente correcta y pulse Confirm (confirmar); aparecerá una pantalla para indicar que la ID del paciente no coincide.

- Vuelva a introducir la ID del paciente y pulse Confirm (confirmar) para ver el resultado de la prueba en la pantalla Result List (resultados).

3. Si la característica de impresión automática del lector está activada, el resultado se imprimirá automáticamente.
4. Pulse ⏏ para abrir el cajetín. Saque el casete de prueba y deséchelo en un recipiente para residuos biopeligrosos.

Interpretación de los resultados

RESULTADO DE LA PRUEBA *APPY*1	INTERPRETACIÓN
NEGATIVO/riesgo bajo de apendicitis	Valor por debajo del punto de decisión clínica de la prueba. El riesgo de que el paciente tenga apendicitis aguda es bajo.
INCONCLUYENTE para apendicitis	Valor por encima del punto de decisión clínica de la prueba. No se puede determinar con certeza el riesgo de que el paciente tenga apendicitis. Consulte a continuación las limitaciones.
RESULTADO NO VÁLIDO O MENSAJE DE ERROR	Repita la prueba. Si después de repetir la prueba el resultado sigue no siendo válido o aparece un mensaje de error, consulte las instrucciones de resolución de problemas del Manual del usuario del *APPY*Reader o contacte con Soporte técnico.

Control de calidad

Características de control integradas

- El software del lector incluye una prueba automática de inicialización en la que se calibran los motores ópticos, se comprueba el sistema de transporte del sistema y el sistema de recepción de la óptica, y se comprueba la integridad de los ajustes del lector. Si no se cumplen las especificaciones preprogramadas, se produce un resultado no válido o aparece un mensaje de error.

Controles externos

*APPY*Reader QC Cassette

- El *APPY*Reader QC Cassette comprueba la óptica y la idoneidad del sistema para garantizar el correcto funcionamiento del lector, y debe utilizarse a diario antes de procesar reactivos de CC o muestras de pacientes. Para poder procesar muestras de pacientes, deben pasarse las pruebas del QC Cassette.
- *APPY*1 Control Kit

  Tiene a su disposición controles líquidos de calidad para comprobar la correcta realización de la prueba *APPY*1. Los intervalos de valores específicos de cada control se facilitan con cada lote. Si es necesario, siga las instrucciones de uso que se entregan con cada kit para procesar los controles. Deben realizarse controles:
  - Al menos una vez al mes
  - Con cada lote y envío nuevos de *APPY*1 Test Kits
  - Si duda de la integridad del sistema, las condiciones de almacenamiento de los reactivos o la fiabilidad del resultado de cualquier prueba
  - Conforme indiquen las recomendaciones nacionales, regionales o locales
  - Conforme a los protocolos de CC de su laboratorio

Limitaciones

1. El resultado **negativo/riesgo bajo de apendicitis** de la prueba *APPY*1 no permite descartar el diagnóstico de apendicitis aguda. En las primeras etapas de la respuesta de la fase aguda (< 24 horas desde la aparición de los síntomas) o en casos de apendicitis focal, los niveles plasmáticos de MRP 8/14 y CRP pueden no alcanzar la significación clínica, lo que daría un resultado falso negativo.
2. El resultado **inconcluyente para apendicitis** de la prueba *APPY*1 no sirve como prueba diagnóstica de la apendicitis aguda, ni debe interpretarse como “positivo”, ya que en otros trastornos inflamatorios o enfermedades infecciosas también aumentan los niveles plasmáticos de MRP 8/14 y CRP además del recuento leucocitario.
3. El resultado de la prueba *APPY*1 se basa en una puntuación calculada mediante un algoritmo exclusivo con múltiples variables. La puntuación se compara después con un punto de decisión clínica predeterminado y se obtiene el resultado de la prueba *APPY*1.

4. La MRP 8/14, la CRP y el recuento leucocitario se regulan al alza de forma inespecífica en enfermedades inflamatorias como las infecciones agudas, lesiones tisulares agudas y otros trastornos inflamatorios. Por tanto, el diagnóstico de apendicitis aguda debe determinarse en el contexto del historial del paciente, y en los hallazgos físicos y clínicos.
5. Las diferencias entre los niveles de CRP en una misma persona pueden variar del 30 al 60%. La variabilidad de la MRP 8/14 también está bien determinada.
6. Los errores durante el procesamiento de las muestras podrían dar resultados falsos negativos o positivos.

Resultados previstos

El algoritmo y el punto de decisión clínica/de corte se derivan de un estudio clínico fundamental en el que participaron 503 pacientes. Basándose en los análisis de la curva de funcionamiento del receptor (ROC) y en el consenso clínico relativo al alta, se determinó el punto de decisión clínica de la prueba *APPY*1. Los pacientes con resultados de la prueba por debajo del punto de corte se consideran NEGATIVOS/de riesgo bajo de apendicitis aguda, y los resultados de la prueba por encima del punto de corte se consideran de riesgo INCONCLUYENTE para apendicitis aguda.

Funcionamiento clínico

El estudio de validación clínica del *APPY*1 System se realizó usando muestras de plasma congeladas archivadas. Las muestras se obtuvieron de un estudio anterior multicéntrico, prospectivo, abierto y observacional relativo a la evaluación, valoración, clasificación y disposición de pacientes de 2 a 20 años de edad que acuden a urgencias con síntomas que sugieren una apendicitis aguda. A los pacientes participantes en el estudio se les extrajo sangre, después se procesó el plasma, y las muestras se congelaron en 2 horas. Las muestras se almacenaron en el mismo centro a ≤ -70 ºC hasta su envío a Venaxis, donde se archivaron y guardaron a ≤ -70 ºC hasta la prueba. Se procedió al análisis ciego de las muestras en el laboratorio de Venaxis usando el *APPY*1 System. Los resultados de la prueba *APPY*1 se compararon con los datos de las altas (negativo para apendicitis aguda, AA-) o los resultados histopatológicos (positivo para apendicitis aguda, AA+) originales de los pacientes.

En el estudio de validación se trabajó con un total de 465 muestras de pacientes extraídas durante estudios clínicos fundamentales anteriores con un volumen suficiente para realizar todo el análisis. La edad de los pacientes era de 2 a 20 años, media de 12,0 ± 4,3 años. Aproximadamente el 49% eran hombres y el 52% mujeres. El 70% eran caucásicos, el 19% hispanos/latinos y el 11% eran de otra etnia. La diferencia en la edad media entre la cohorte AA+ (12,5 ± 3,8) y la AA- (11,9 ± 4,5) no fue significativa.

Resultados de la prueba *APPY*1 comparados con el diagnóstico clínico

Resultado de la prueba APPY1 N=465	**AA-**	**AA+**	
Por debajo del valor de corte: NEGATIVO/Riesgo bajo de AA	154	6	160
Por encima del valor de corte: INCONCLUYENTE para AA	179	126	305
	333	132	465

Datos de funcionamiento clínico

Medida	**Estimación (IC del 95%)**
Prevalencia de AA	28,4% (24,5 – 32,6)
Sensibilidad	95,5% (90,4 – 97,9)
Especificidad	46,2% (41,0 – 51,6)
VPN	96,3% (92,1 – 98,3)
VPP	41,3% (35,9 – 46,9)
Razón de probabilidad positiva	1,78 (1,60 – 1,99)
Razón de probabilidad negativa	0,098 (0,045 – 0,217)

Funcionamiento analítico

Límite de detección

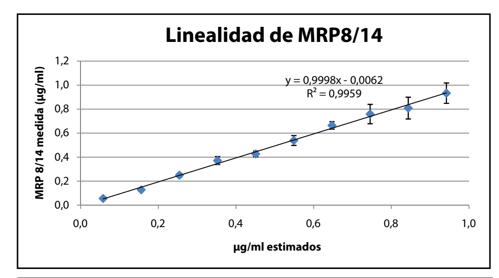
El límite de blanco (LOB), el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) los determinaron 2 operadores mediante el análisis de 3 lotes de *APPY*1 Test Kits frente a 6 muestras de plasma y muestras en blanco de amortiguador de prueba *APPY*1 durante 3 días; las muestras se aleatorizaron cada día.

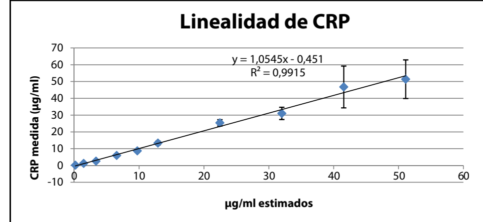
LOD, LOB y LOQ

Límite	CRP, µg/mL	MRP, µg/mL
Blanco	0.201	0.030
Detección	0.254	0.045
Cuantificación	0.341	0.064

Linealidad

En cada analito, se demostró la linealidad de un intervalo desde aproximadamente el LOD/LOQ hasta por encima del valor superior de truncamiento del ensayo. El ensayo es lineal con ambos analitos en el intervalo del valor de corte clínico. El ensayo de MRP es lineal desde 0,052 a 0,933 µg/ml; el ensayo de CRP es lineal desde 0,187 a 51,4 µg/ml. Al usar el LOD de CRP como valor inferior, el ensayo de CRP es lineal desde 0,254 µg/ml a 51,4 µg/ml.





Precisión

La precisión de la prueba *APPY*1 se evaluó conforme a la norma EP-5A2 del CLSI, "Evaluación de la precisión de los métodos de medición cuantitativos; recomendaciones aprobadas". Se analizaron 5 muestras de plasma entre el LOQ y el valor de corte (Puntuación de la prueba *APPY*1 de 4,0), en o aproximadamente en el valor de corte, y en intervalos por encima del valor de corte durante 20 días, realizando 2 ciclos al día con 2 réplicas por ciclo y 1 operador. Las muestras se aleatorizaron entre 5 lectores cada día de prueba. Para poder calcular la puntuación de la prueba *APPY*1, se asignó un recuento leucocitario fijo a cada muestra. El coeficiente de variación porcentual total (CV %) fue del 0,0 al 2,8 % en la puntuación de la prueba *APPY*1, del 6,5 al 12,0 % en la MRP 8/14, y del 4,8 al 15,1 % en la CRP. Cerca del punto de decisión clínica establecido, los CV % en la MRP 8/14 y CRP fueron ≤ 10,6 %.

Pruebas de precisión: puntuación de la prueba *APPY*1 con recuento leucocitario fijo

Muestra	N	*Puntuación de la prueba APPY1 (media)*	Intraensayo		Entre ensayos		Total	
			DE	CV %	DE	CV %	DE	CV %
1	80	3,2	0,000	0,0	0,000	0,0	0,000	0,0
2	80	3,9	0,000	0,0	0,000	0,0	0,000	0,0
3	80	4,0	0,050	1,2	0,000	0,0	0,050	1,2
4	80	4,1	0,037	0,9	0,027	0,7	0,046	1,1
5	80	5,2	0,143	2,8	0,000	0,0	0,148	2,8

Pruebas de precisión: concentración de MRP 8/14

Parámetros		Muestra				
		1	2	3	4	5
MRP 8/14 µg/mL						
Media		0,10	0,15	0,24	0,31	0,52
Reproducibilidad (intraensayo)	DE	0,006	0,009	0,024	0,016	0,058
	CV %	6,3	6,1	10,0	5,1	11,2
Entre ensayos	DE	0,000	0,007	0,002	0,012	0,000
	CV %	0,0	4,5	0,7	3,8	0,0
Total	DE	0,006	0,011	0,025	0,021	0,062
	CV %	6,5	7,1	10,6	6,9	12,0

Pruebas de precisión: concentración de CRP

Parámetros		Muestra				
		1	2	3	4	5
CRP µg/mL						
Media		0,58	2,31	5,06	5,25	18,88
Reproducibilidad (intraensayo)	DE	0,027	0,126	0,341	0,364	2,953
	CV %	4,6	5,5	6,7	6,9	15,6
Entre ensayos	DE	0,013	0,097	0,280	0,262	0,000
	CV %	2,3	4,2	5,5	5,0	0,0
Total	DE	0,028	0,149	0,453	0,453	2,851
	CV %	4,8	6,5	8,6	8,6	15,1

Reproducibilidad

Tres operadores evaluaron la reproducibilidad en el laboratorio de Venaxis, cada uno con un lector exclusivo, y los resultados se enmascararon a los otros operadores. La combinación de un operador y un lector se consideró un "centro" individual, lo que da un total de 3 centros. Cada operador analizó 5 muestras de plasma más 2 controles durante 3 días, con 2 ciclos al día y 2 réplicas por ciclo. El orden de las muestras cambió en cada ciclo. Para calcular la puntuación de la prueba *APPY*1, se asignó un recuento leucocitario fijo a cada muestra. En la puntuación de la prueba *APPY*1, el CV % intraensayo (repetibilidad) fue ≤ 3,4 %, el CV % entre ensayos fue ≤ 0,9 %, el CV % entre días fue ≤ 0,7 %, y el CV % entre operadores/centros fue ≤ 0,5 %. La imprecisión total (reproducibilidad) fue ≤ 3,4 %. Los resultados de la puntuación de la prueba *APPY*1, la MRP 8/14 y la CRP se muestran a continuación:

Pruebas de reproducibilidad: puntuación de la prueba *APPY*1 con recuento leucocitario fijo

Parámetros		Muestra				
		1	2	3	4	5
Puntuación de la prueba APPY1						
Media		3,2	3,9	4,0	4,2	5,4
Reproducibilidad (intraensayo)	DE	0,014	0,019	0,048	0,049	0,168
	CV %	0,4	0,5	1,2	1,2	3,1
Entre ensayos	DE	0,004	0,010	0,019	0,017	0,049
	CV %	0,1	0,3	0,5	0,4	0,9
Entre días	DE	0,005	0,014	0,010	0,012	0,036
	CV %	0,1	0,4	0,2	0,3	0,7
Entre operadores	DE	0,003	0,005	0,011	0,010	0,030
	CV %	0,1	0,1	0,3	0,3	0,5
Reproducibilidad (total)	DE	0,015	0,026	0,054	0,054	0,182
	CV %	0,5	0,7	1,3	1,3	3,4

Pruebas de reproducibilidad: concentración de MRP 8/14

Parámetros		Muestra				
		1	2	3	4	5
MRP 8/14 (µg/ml)						
Media		0,10	0,15	0,25	0,34	0,59
Reproducibilidad (intraensayo)	DE	0,003	0,010	0,029	0,026	0,656
	CV %	2,9	6,6	11,5	7,7	11,1
Entre ensayos	DE	0,002	0,005	0,009	0,008	0,013
	CV %	1,9	3,1	3,5	2,3	2,3
Entre días	DE	0,003	0,007	0,006	0,007	0,017
	CV %	2,6	4,7	2,4	2,0	3,0
Entre operadores	DE	0,010	0,002	0,006	0,006	0,015
	CV %	9,6	1,6	2,5	1,7	2,5
Reproducibilidad (total)	DE	0,009	0,013	0,031	0,029	0,071
	CV %	8,6	8,8	12,6	8,4	12,0

Pruebas de reproducibilidad: concentración de CRP

Parámetros		Muestra				
		1	2	3	4	5
CRP (µg/ml)						
Media		0,63	2,52	5,55	5,94	24,34
Reproducibilidad (intraensayo)	DE	0,039	0,166	0,309	0,568	3,375
	CV %	6,1	6,6	5,6	9,6	13,9
Entre ensayos	DE	0,016	0,130	0,281	0,228	1,226
	CV %	2,5	5,2	5,1	3,8	5,0
Entre días	DE	0,012	0,116	0,065	0,132	0,743
	CV %	1,9	4,6	1,2	2,2	3,1
Entre operadores	DE	0,009	0,048	0,099	0,121	0,902
	CV %	1,4	1,9	1,8	2,0	3,7
Reproducibilidad (total)	DE	0,044	0,245	0,434	0,638	3,776
	CV %	7,0	9,7	7,8	10,7	15,5

Interferencias

Se analizaron muestras de mezclas de plasma con concentraciones bajas, medias y altas de MRP 8/14 y CRP para evaluar las interferencias con hemoglobina, bilirrubina (conjugada y sin conjugar), lecitina, anticuerpos antimurinos humanos (HAMA), factor reumatoide (RF) e inmunoglobulina G (IgG). Los valores de control de cada mezcla de plasma (L, M, H) se determinaron con la media de 3 réplicas. El efecto de cada sustancia potencialmente interferente se evaluó usando la media de las 3 réplicas de cada mezcla de plasma. A cada mezcla de plasma se le asignó un recuento leucocitario para poder calcular la puntuación de la prueba *APPY*1. A la mezcla de plasma con concentración baja se le asignó un recuento leucocitario de 4, a la mezcla con concentración media se le

asignó un recuento de 7 y a la mezcla con concentración alta se le asignó un recuento de 10; las puntuaciones respectivas de la prueba *APPY*1 fueron 3,1, 3,6 y 4,6. No se observaron interferencias importantes en la puntuación de la prueba *APPY*1 en ninguna de las sustancias interferentes; todas las diferencias fueron inferiores al 10%. No obstante, se detectó una posible interferencia con niveles bajos de MRP 8/14 cuando se provocó la muestra con bilirrubina sin conjugar. Como se demuestra en el gráfico siguiente, la interferencia tuvo muy poco efecto en la puntuación de la prueba *APPY*1. Además, se detectó una interferencia con niveles bajos de CRP cuando se comparó la muestra de plasma RF positiva con su control. No obstante, se detectaron niveles bajos de CRP en esta muestra mediante inmunotransferencia, independientemente del resto de mezclas. Si se analiza una fuente más pura de RF, la diferencia porcentual que se muestra más abajo se reduciría. Se obtuvo un resultado similar en todos los niveles de MRP 8/14 cuando se analizó la interferencia con IgG. Se observó que la IgG purificada se contamina con MRP 8/14, y si se obtiene un material de origen más puro los efectos de interferencia indicados más abajo también podrían reducirse.

Pruebas de interferencia: prueba *APPY*1

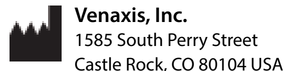
Posible sustancia interferente	**Concentración**	**Mezcla baja Prueba *APPY*1 Punt. = 3,1**	**Mezcla media Prueba *APPY*1 Punt. = 3,6**	**Mezcla alta Prueba *APPY*1 Punt. = 4,6**
		Diferencia porcentual respecto a la muestra de control o DEN		
Hemoglobina	2 g/l	0,69	-0,79	-0,08
Bilirrubina (no conjugada)	342 µmol/l	1,37	0,56	1,78
Bilirrubina (conjugada)	342 µmol/l	-0,28	-1,52	-1,80
Lecitina	11,1 mmol/l	0,38	-0,09	0,17
HAMA	153,3 ng/ml	0,24	-0,93	-2,18
Factor reumatoide	60 IU/ml	0,06	0,42	-1,99
IgG	52,8 mg/ml	5,55	7,06	4,30

REFERENCES

1. EU Market Study by Venaxis, Inc. (Benelux, France, Italy, Germany, UK), 2012.
2. Venaxis analysis of data from: National Hospital Ambulatory Medical Care Survey, 2010. Available at: http://www.cdc.gov/nchs/ahcd/ahcd_questionnaires.htm#public_use. Accessed November 2012.
3. Addiss D, et al. The Epidemiology of Appendicitis and Appendectomy in the United States. American Journal of Epidemiology. 1990;132:910-25.
4. Becker, et al. Atypical Clinical Features of Pediatric Appendicitis. Academic Emergency Medicine. 2007;14:124-129.
5. Brennan G. Pediatric Appendicitis: Pathophysiology and appropriate use of diagnostic imaging. Canadian Journal of Emergency Medicine. 2006;8:425-432.
6. Kharbanda, et al. A Clinical Decision Rule to Identify Children at Low Risk for Appendicitis. Pediatrics. 2005;116:709-716.
7. Huckins DS, et al. A novel biomarker panel to rule out acute appendicitis in pediatric patients with abdominal pain, American Journal of Emergency Medicine. (in press), http://dx.doi.org/10.1016/j.ajem.2013.06.016.
8. Cardall, et al. Clinical Value of the Total White Blood Cell Count and Temperature in the Evaluation of Patients with Suspected Appendicitis. Academic Emergency Medicine. 2004;11:1021-1027.
9. Hennelly K and Bachur R. Appendicitis Update. Current Opinion Pediatrics. 2011;23:1-5.
10. Wan M, et al. Acute Appendicitis in Young Children: Cost Effectiveness of US versus CT in Diagnosis – A Markov Decision Analytical Model. Radiology. 2009;250:378-386.
11. Glatter R. What role do imaging studies play in diagnosing pediatric appendicitis in the ED? MedScape Emergency Medicine, Web MD. June 18, 2010. Available at: http://www.medscape.com/viewarticle/723549. Accessed April 9, 2012.
12. Stoker J, et al. Imaging patients with acute abdominal pain. Radiology. 2009;253:31-46.
13. Bachur R, et al. Advanced Radiologic Imaging for Pediatric Appendicitis: 2005-2009 Trends and Outcomes. Journal of Pediatrics. 2011.
14. Menoch M, et al. Trends in Computed Tomography Utilization in the Pediatric Emergency Department. Pediatrics. 2012:129:e690-e697.
15. Bealer J and Colgin M. S100A8/A9: A potential New diagnostic Aid for Acute Appendicitis. Academic Emergency Medicine. 2010:17:333-336.
16. Mills A, et al. Diagnostic Characteristics of S100A8/A9 in a Multicenter Study with Patients With Acute Right Lower Quadrant Abdominal Pain. Academic Emergency Medicine. 2012;19:48-55.
17. Kharbanda A, et al. Novel Serum and Urine Markers for Pediatric Appendicitis. Academic Emergency Medicine. 2012;19:56-62.
18. Thuijl G, et al. A Pilot study on potential new plasma markers for diagnosis of acute appendicitis. 2010.
19. Shindoh J, et al. Diagnostic Power of Inflammatory Markers in Predicting Severity of Appendicitis. Hepato-Gastroenterology. 2011;58:2003-2006.
20. Cole M, Maldonado N. Evidence-Based Management of Suspected Appendicitis in the Emergency Department. Emergency Medicine Practice. 2011;13:1-32.
21. Siddique K, et al. Diagnostic accuracy of white cell count and C-reactive protein for assessing the severity of paediatric appendicitis. Journal of the Royal Society of Medicine. 2011;2:59.
22. Doraiswamy NW. Progress of acute appendicitis: a study in children. British Journal of Surgery 1978;65:877-9.

Symbol Key: Symbolschlüssel: Leyenda de los símbolos: Légende des symboles: Descrizione dei simboli: Verklaring van symbolen:

Symbol Symbol Símbolo Symbole Simbolo Symbool	EN DE ES FR IT NL	Used for Verwendet für Significa Utilisé pour Spiegazione Gebruikt voor	CE	CE Mark CE-Zeichen Marca CE Marque CE Marcatura CE CE-markering	CONT	Contents Inhalt Contenido Contenu Contenuto Inhoud



Venaxis, Inc.
1585 South Perry Street
Castle Rock, CO 80104 USA

www.venaxis.com
Tel: +1-303-794-2000
Fax: +1-303-798-8332

EC REP **Emergo Europe**
Molenstraat 15
2513 BH, The Hague,
The Netherlands

CE

The *APPY*1 Test Kit is for U.S. Export Only.